младших возрастов не покидают придонного субстрата, где они развиваются. Выход личинок в почву берега для окукливания происходит у генерации синхронно, и последующий выплод насекомых также осуществляется в течение полутора — двух недель. Время от выхода личинки в почву берега до выплода слепня составляет в среднем двадцать дней.

Андреева Р. В. Об эколого-морфологической типизации личинок слепней (Diptera, Tabanidae).— Энтомол. обозрение, 1982, 81, № 1, с. 43—49.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена АН УССР,
Институт зоологии АН АрмССР
Получено 03.12.82

УДК 591.84:596

Е. И. Домашевская

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ НАДКОСТНИЦЫ У НЕКОТОРЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Авторадиографические исследования надкостницы бедренной кости половозрелых крыс дали основание предположить, что синтез ДНК в отдельных фракциях клеток периоста связан не только с подготовкой к митотическому делению, но, возможно, с образованием некоторого полиплоидного фонда клеток с определенной потенцией к дифференцировке (Домашевская, 1970; Домашевская, Медвецкий, 1973). В этой статье приводятся результаты сравнительного исследования надкостницы низших позвоночных и млекопитающих с учетом особенностей клеточного состава.

Материалом для исследования служили бедренные кости взрослых белых крыс и жерлянок. Тотальные препараты надкостницы готовили, выделяя под бинокулярным микроскопом отдельно наружный и внутренний ее слои. Подготовленные пленочные препараты фиксировали 30—35 мин в смеси спирт — формалин — уксусная кислота (1 : 3 : 0,3), затем окрашивали по Фельгену с предварительной обработкой в 1N растворе соляной кислоты (10 мин при 60°). Время экспозиции в реактиве Шиффа при 37° составляло 45 мин. В качестве эталона при фотометрии использовали сперматозоиды соответствующих видов, мазки которых наносились на предметные стекла с препаратами надкостницы. Таким образом, клетки надкостницы и ядра сперматозоидов окрашивались для фотометрии в идентичных условиях.

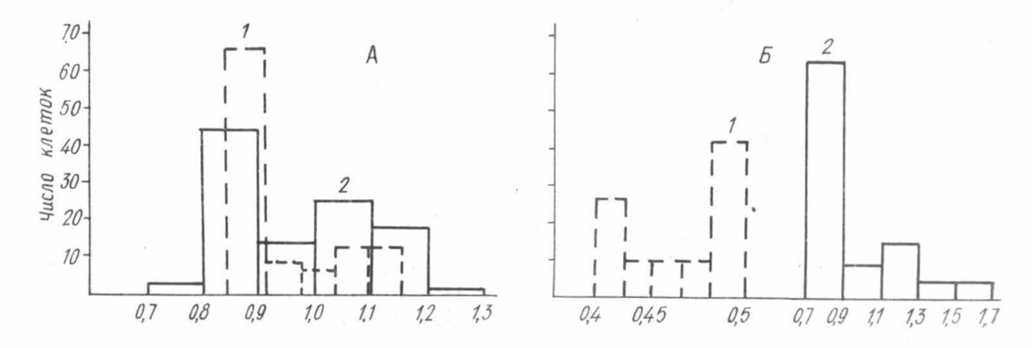
Отдельные пленочные препараты надкостницы крысы и жерлянки готовили для изучения состояния клеток внутреннего и наружного слоя по показателю люминесценции. С этой целью препараты надкостницы обрабатывались акридиновым оранжевым по общепринятой методике. Интенсивность люминесценции ядер регистрировали с помощью фотометрической насадки ФМЭЛ-42 (Карнаухов, 1979).

Оптическую плотность ДНК-фуксина в ядрах клеток надкостницы измеряли на зондовом цитоспектрофотометре МУФ-5 однолучевым двухволновым методом. Снятие первичных данных и подсчет средней оптической плотности проводились по двухволновой методике, усовершенствованной Белоножко и Колегаевым (1976). Определение оптической плотности ядер осуществлялось зондом 0,07 (об. 50 ок. 7) в 3—5 точках при длинах волн 540 и 580 нм. Диаметры ядер измеряли окуляр-микрометром МОВ-1-15х. Площадь ядер вычисляли по формулам площадей эллипса и круга. Условные значения плоидности выражали как отношение оптической плотности ядер клеток периоста к оптической плотности сперматозоидов. Оценка достоверности полученных данных проводилась: для интенсивности люминесценции по методу Монцевичюте — Эрингене (Кононский, 1976); для средней оптической плотности — по критерию Стьюдента (Терентьев, Ростова, 1977).

Надкостница бедренной кости у взрослых крыс и жерлянок имеет ряд сходных черт. Морфологически она представлена двумя слоями: внутренним, содержащим преимущественно остеогенные клетки, и наружным — с фибробластоподобными клетками и хорошо развитым фибриллярным каркасом из коллагеновых и эластических волокон. В средней трети диафиза кости у крысы и у жерлянки на продольных гистологических срезах в надкостнице насчитывается два-три ряда клеток. Однако встречаются участки надкостницы, состоящие из одного слоя остеобластов округлой или, в ряде мест, уплощенной формы. Остеоген-

ные клетки у взрослых животных полиморфны, и этот полиморфизм отражает их функциональное состояние. В периосте с двумя и более слоями клеток наружные слои представлены фибробластоподобными формами и фиброцитами. Фиброциты отличаются более мелкими уплотненными ядрами удлиненно-овальной формы (D=15—16 мкм при d=1,3 мкм).

Аналогичное строение периоста наблюдается также и у жерлянки, хотя клетки обоих слоев здесь отличаются более крупными размерами по сравнению с клетками периоста крысы. Среди клеток наружного слоя



Распределение клеток внутреннего (*А*) и наружного (*Б*) слоев надкостницы крысы (*1*) и жерлянки (*2*) по суммарной интенсивности люминесценции.

у животных исследованных видов фигуры митоза встречаются весьма редко. Так, в наружном слое надкостницы крысы митотический индекс равен 0,11—0,35 %.

Внутренний слой надкостницы земноводных и млекопитающих содержит кроме коллагеновых волокон, ориентированных, как правило, по длине кости, большое число продольно расположенных, образующих сеть эластических волокон. Наряду с остеобластами, ядра которых имеют преимущественно округлую форму, обнаруживаются преостеобласты с эллипсовидными(крыса) или бобовидными (жерлянка) ядрами. Среди клеток внутреннего слоя надкостницы у белой крысы регистрируются фигуры митозов, чаще встречающиеся среди преостеобластов, и весьма редко — среди остеобластов; здесь же встречаются двуядерные остеобласты, которые обычно крупнее одноядерных. Митотический индекс для периостальных клеток крысы невысок: 0,12±0,02 % для остеобластов и 0,24±0,01 % для преостеобластов. Во внутреннем слое надкостницы жерлянки фигуры митоза также редки, хотя на ядрах часто можно видеть фигуры перетяжек; так же как и у крысы встречаются двуядерные клетки.

Флуоресцентная микроскопия показывает, что ядра двуядерных клеток флуоресцируют более интенсивно, чем одноядерных. Распределение ядер по интенсивности люминесценции во внутреннем слое периоста крысы и жерлянки совпадает; наибольший процент клеток ($P<1$) приходится на клетки с интенсивностью люминесценции 0,8—0,9 усл. ед. (рисунок). Интенсивность свечения ядер в наружном слое периоста у жерлянки вдвое выше, чем у крысы. Во внутреннем и в наружном слоях периоста жерлянки для большего числа клеток характерно свечение в 0,7—0,9 усл. ед.; в периосте крысы клетки со слабой интенсивностью свечения составляют больший процент.

Результаты цитофотометрических определений содержания ДНК в ядрах периостальных клеток крысы и жерлянки приведены в таблице. Клетки периоста животных различных классов обнаруживают сходство как по величинам плоидности, так и по количественному распределению отдельных классов плоидности. Наиболее многочисленный класс составляют клетки, ядра которых содержат диплоидный набор хромосом. От-

носительно небольшое количество их составляет класс с содержанием ДНК от 2 n<m<4 n. Еще меньше класс дипоплоидных ядер в надкостнице крысы и, напротив, значительный процент таких ядер в надкостнице жерлянки. Наименьшие по представительству классы тетраплоидных и гипертетраплоидных клеток. Были зарегистрированы также клетки с количеством ДНК меньше 1,5 n и больше 4,6 n. Бродский и Урываева (1981, 1970) в специальном исследовании в аналогичном случае предполагают наличие клеток, разделившихся ацитокинетическим митозом, с неравномерным распределением хромосом. В периосте жерлянки встречаются двуядерные клетки с плоидностью 2,1 n и 1,5 n, а также 3 n и 4,2 n. Дочерние ядра в сумме не всегда составляли 4 n. Можно предполагать поэтому, что двуядерные клетки появились в результате неравномерного ацитокинетического митоза.

Результаты цитофотометрического исследования в основном совпадают с данными, полученными методом авторадиографии. Связь между размером ядра и его плоидностью устанавливали с помощью регрессионного анализа. Наличие некоторой положительной связи между этими величинами говорит о существовании истинной полиплоидии некоторых клеток внутреннего слоя надкостницы.

Ядра большинства клеток наружного слоя периоста у исследованных животных представлены диплоидными формами. Вместе с тем у жерлянки клетки наружного слоя проявляют более высокую пролиферативную активность. Об этом свидетельствует выявление на гистоавтографах клеток в фазе синтеза ДНК и более высокий митотический индекс. Примечательно, что у крысы в фазу синтеза митотического цикла вступают клетки не только с исходным диплоидным, но и с тетраплоидным набором ДНК. Некоторые диплоидные клетки, переходящие в синтетическую фазу цикла, после завершения редупликации ДНК делятся. К такому выводу склоняет, в частности, тот факт, что фракция тетраплоидных клеток в количественном отношении явно уступает фракции в фазе синтеза ДНК (таблица).

Распределение клеток надкостницы бедренных костей крысы и жерлянки по содержанию ДНК

Слой надкостницы	Количество ДНК (единицы плоидности)					
	m<2n		m=2n		2n<m<4n	
	%	M	%	M	%	M
Крыса						
Наружный	3	1,0±0,03	86	2,0±0,08	9	3,1±0,04
Внутренний	2	1,3±0,04	60	2,0±0,04	26	3,1±0,05
Жерлянка						
Наружный	30	1,5±0,04	70	2,0±0,07	—	—
Внутренний	17	1,5±0,04	61	2,0±0,03	19	3,0±0,04

Слой надкостницы	Количество ДНК (единицы плоидности)					
	m=4n		4n<m<8n		8n<m	
	%	M	%	M	%	M
Крыса						
Наружный	2	4,0±0,03	—	—	—	—
Внутренний	5	4,0±0,01	3	5,6±0,02	4	9,7±0,03
Жерлянка						
Наружный	—	—	—	—	—	—
Внутренний	1	4,0±0,05	—	—	2	9,4±0,06

Из наблюдений следует, что для обоих слоев периоста крысы и жерлянки ведущим механизмом физиологической регенерации и пополнения клеточного состава является репродукция клеток, а основной их пролиферативный резерв представлен диплоидными клетками.

В специальной литературе мы не нашли данных об изменчивости плоидности ядер клеток периоста животных. Имеются лишь единичные работы по остеобластам эндоста млекопитающих (Мажуга, Вечерская, 1973); в некоторых работах сообщается о низкой пролиферативной активности клеток наружного слоя периоста (Owen, 1963; Pritchard, 1952). Другие авторы (Левикова, 1950) рассматривают эти клетки как источник пополнения остеогенных клеток. Наши наблюдения свидетельствуют, что клетки наружного слоя периоста несут преимущественно, а возможно и исключительно, опорно-трофическую функцию и в пополнении клеток остеобластического ряда не участвуют. Кроме того, полиплоидизация части клеток внутреннего слоя периоста растущей кости является результатом перестройки основных функциональных единиц в процессе созревания структуры. Эта перестройка связана с интенсификацией остеопластического процесса и с повышением функциональной активности остеобластов.

Интенсивность люминесценции клеток надкостницы показывает их различное функциональное состояние. Различия наблюдаются как между клетками наружного и внутреннего слоев, так и между клетками внутреннего слоя. Одним из способов интенсификации функции остеобластов является соматическая полиплоидия.

Ведущим механизмом физиологической регенерации клеток обоих слоев периоста в растущей кости крысы и жерлянки является клеточная репродукция митотическим делением, и основной пролиферативный резерв представлен диплоидными клетками. Среди клеток наружного слоя периоста у земноводных и млекопитающих соматическая полиплоидия не отмечена.

Бродский В. Я. Развитие и свойства полиплоидных клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих.— Онтогенез, 1970, **1**, с. 229—247.

Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка.— М. : Наука, 1981.— 260 с.

Белоножко А. П., Колегаев М. Д. О возможности применения двухволнового метода фотометрических измерений на двухлучевом сканирующем цитоспектрофотометре МУФ-5.— Цитология и генетика, 1976, **10**, № 2, с. 163—166.

Домашевская Е. И. Показатели синтеза ДНК в ядрах клеток развивающегося периоста в связи с их пролиферативными свойствами (авторадиографическое исследование).— В кн.: Метаболизм клеточного ядра и ядерно-цитоплазматические отношения. Киев, 1970, с. 273—276.

Домашевская Е. И., Медвецкий Е. Б. Флуоресценция клеток надкостницы и регенерата кости, развивающегося при ее повреждении.— Цитология и генетика, 1973, **7**, № 1, с. 9—13.

Кононский А. П. Гистохимия.— К. : Вища школа, 1976, с. 82—92.

Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки.— М. : Наука, 1978.— 207 с.

Левикова В. П. Наблюдения над экспериментальным остеогенезом у кролика.— Докл. АН СССР, 1950, **71**, № 1, с. 149—152.

Мажуга П. М., Вечерская Т. П. Некоторые показатели синтеза ДНК и белков коллагенового типа в остеобластах эндоста бедренной кости белой крысы.— Цитология и генетика, 1973, **7**, № 5, с. 429—430.

Терентьев П. В., Ростова Н. С. Практикум по биометрии.— Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1977.— 151 с.

Owen M. Cell population kinetics of an osteogenic tissue.— J. Cell Biol. 1963, **19**, p. 19—32.

Pritchard J. J. A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat.— J. Anat., 1952, **86**, p. 220—237.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена
АН УССР

Получена 27.01.83